

УДК 543.5;547.96;577

РОЛЬ АЛЬБУМИНОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ В ПРОВЕДЕНИИ РЕГУЛЯТОРНОГО СИГНАЛА У МЛЕКОПИТАЮЩИХ

© 2021 г. М. С. Краснов¹, *, А. П. Ильина², В. П. Ямскова², **

¹Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Москва, Россия

²Институт проблем биорегуляции, Москва, Россия

*e-mail: embrmsk@mail.ru

**e-mail: yamskova-vp@yandex.ru

Поступила в редакцию 11.01.2021 г.

После доработки 11.01.2021 г.

Принята к публикации 11.01.2021 г.

Представлен обзор данных по исследованию структуры, физико-химических свойств и биологической активности белково-пептидных комплексов (БПК), локализованных внеклеточно, участвующих в межклеточной адгезии и активирующих клеточные источники регенерации в тканях позвоночных. БПК состоят из определенных изоформ сывороточного альбумина и пептидов – продуктов протеолиза известных мембранных и адгезивных белков. Биологическое действие БПК характеризуется наличием тканевой, но отсутствием видовой специфичности, а также дозовой зависимостью. В растворах БПК находятся в виде наноразмерных частиц, это состояние связано с проявлением биологической активности. Рассматривается возможный механизм строения БПК и его взаимодействия с плазматической мембраной клетки.

Ключевые слова: альбумины, сыворотка крови, биорегуляторы

DOI: 10.31857/S0042132421040049

ВВЕДЕНИЕ

Мембранотропные гомеостатические тканеспецифические биорегуляторы (МГТБ) были обнаружены в различных тканях позвоночных (млекопитающих, птиц, амфибий, рыб) и беспозвоночных животных (Ямскова, Резникова, 1979; Ямскова и др., 2012). Эти биологически активные вещества были выделены в отдельную группу на основании общности проявляемых физико-химических свойств и характера биологического действия. Было установлено, МГТБ локализованы в межклеточном пространстве тканей. Они влияют на основные биологические процессы (адгезию, миграцию, пролиферацию, дифференцировку клеток), стимулируют восстановление и регенерацию в патологически измененных тканях. Активность МГТБ характеризуется отсутствием видовой, но наличием тканевой специфичности (Ямскова и др., 2012). Исследование МГТБ оказалось возможным благодаря разработке нового экспериментального подхода, сочетающего в себе методы выделения, очистки, изучения физико-химических свойств, а также метод биотестирования биорегуляторов этой группы и изучения специфической биологической активности (Ямскова, Резникова, 1991).

Выделение биорегуляторов данной группы из тканей осуществляется путем экстракции небольших фрагментов свежеполученной ткани животных при низкой температуре в физиологическом растворе. При этом исключается гомогенизация ткани, ферментативная обработка и другие воздействия, вызывающие нарушение целостности клеток. Было высказано предположение, что основным фактором, определяющим переход биорегуляторов данной группы во внешнюю среду, является температура экстрагирующего раствора – 4°C. При этой температуре происходит фазовый переход бислоя плазматической мембраны (ПМ), в результате которого связанная с ним (например, через мембранные якоря) надмолекулярная белковая структура может “соскочить” с ПМ и перейти во внешнюю среду (Ямскова, Резникова, 1979). Присутствие ионов кальция в экстрагирующем растворе не оказывает влияния на процесс выделения МГТБ (Ямскова и др., 1990).

МГТБ млекопитающих имеют сложный состав. Их основу составляют белково-пептидные комплексы (БПК), содержащие биологически активные пептиды с мол. массой от 1000 до 6000 Да и белок-модулятор, который модулирует их активность, причем в различных тканях это может при-

Таблица 1. Перечень сигналов масс-спектров пептидов, идентифицированных в супернатантах тканевых экстрактов быка и крысы (Ильина и др., 2011)

Ткань, из которой выделен пептид	M(m/z)
Склера глаза быка	4171, 4302, 4531, 4819
Роговица глаза быка	1442, 3376, 3973, 4302, 4418, 4531, 4817, 8604
Хрусталик глаза быка	4302, 4529, 4817, 8604
Радужка глаза быка	3944, 4301
Цилиарное тело глаза быка	4301
Стекловидное тело глаза быка	4300, 4370, 4420
Сетчатка глаза быка	4302, 4528, 4819, 8603
Пигментный эпителий глаза быка	4303, 4372, 4532, 4819
Сыворотка крови быка	1151, 1448, 1666, 1812, 1915, 2016
Эмбриональная сыворотка крови быка	4301, 8601
Печень быка	2112, 2170, 2866, 2940, 3009, 3151, 5026, 5237
Печень крысы	3649, 5025
Мозг крысы	2820, 3481, 4300, 4331, 4403, 4671, 4749, 4801, 9945
Сердце крысы	3049, 3262, 7565, 7684, 8463, 8581, 8766, 8967, 9094, 9951, 10404
Кость крысы	4301

водить как к ее ингибированию, так и к ее увеличению или даже нивелированию (Ямскова, Резникова, 1991; Ямскова и др., 2004, 2009б, 2012). Ионы кальция участвуют в поддержании структуры, активности МГТБ и в образовании БПК (Ямскова, 1978; Краснов и др., 2003а; Ямсков и др., 2009). Результаты масс-спектрометрического исследования пептидов, входящих в состав МГТБ, показывают, что для ткани соответствующего органа определенного вида животного существует постоянный набор пептидов (табл. 1) (Ямскова и др., 2004, 2009б; Ильина и др., 2011).

Для некоторых МГТБ удалось идентифицировать первичную структуру пептидов. Прибегнув к методам протеомного анализа, было установлено, например, что полипептид с молекулярной массой 4749 ± 2 Да, отвечающий за проявление биологической активности МГТБ, выделенного из головного мозга крысы, является N-концевым участком гуанин-нуклеотидсвязывающего G₀-белка мозга крысы (Ильина и др., 2014); пептид с молекулярной массой 4372 ± 2 Да, выделенный из пигментного эпителия глаза крупного рогатого скота (КРС), структурно идентичен N-концевому фрагменту фосфодиэстеразы циклического ГМФ (КФ 3.1.4.17) сетчатки КРС (Ильина и др., 2011); в результате ледерного секвенирования карбокси-пептидазой Y были идентифицированы C-концевые последовательности двух пептидов, входящих в состав МГТБ, выделенного из сыворотки крови, — аминокислотная последовательность пептида с молекулярной массой 1448 ± 2 Да гомологична N-концевому фрагменту Р-кадгерина эндотелия бычьей аорты; C-концевая аминокис-

лотная последовательность пептида с молекулярной массой 1151 ± 2 Да структурно сходна с N-концевой последовательностью фрагмента киназного домена регуляторного белка TRB-2 гранулоцитов КРС (Ильина и др., 2019). Таким образом, результаты исследований показали, что пептиды МГТБ являются продуктами протеолиза различных белков поверхности клетки, плазматической мембраны — ферментов, молекул адгезии, G₀-белков.

Исследуя белки-модуляторы МГТБ, выделенных из различных тканей КРС (сыворотка крови, склера, пигментный эпителий (ПЭ), роговица, передняя камера глаза, зрительный нерв, стекло-видное тело, цилиарное тело, пещеристое тело, яичники, семенники и др.), а также крысы (сыворотка крови, мозг, печень и легкое), было установлено, что они имеют молекулярную массу около 66 кДа (Ямскова и др., 2004; 2009б). Идентификация частичной N-концевой аминокислотной последовательности этих белков показала наличие 100%-ной гомологии с сывороточными альбуминами (СА) быка и крысы, соответственно (Ильина и др., 2019).

Таким образом, полученные результаты предполагают, что МГТБ по сути представляют собой ранее обнаруженные (Peters, 1996), но мало изученные “тканевые формы” альбуминов, которые образовались в результате проникновения СА через гистогематические барьеры организма в межклеточные пространства тканей и взаимодействия по кальций-зависимому механизму с определенными пептидами. Образовавшиеся БПК представляют основу биорегуляторов данной группы. Они характеризуются локализацией в

межклеточном пространстве тканей, оригинальным строением и проявлением уникальных физико-химических свойств, а также выполнением важнейшей функции – участием в проведении и передаче информационного сигнала в организме на органно-тканевом уровне (Ямскова, Ямсков, 1999; Ямскова и др., 2012). Возможно, именно такое взаимодействие лежит в основе “самосборки” МГТБ в межклеточном пространстве. В пользу этого предположения свидетельствует уникальная способность молекулы СА связывать обширный круг лигандов, осуществляя транспорт огромного количества различных веществ в организме. В основе такой важнейшей функции альбумина лежит структурная подвижность его молекулы (Peters, 1996; Kragh-Hansen et al., 2013).

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА АЛЬБУМИНА

Подробное описание структуры СА, распределение в организме, его свойства и функции подробно описаны в книге (Peters, 1996). В настоящем обзоре мы отметим наиболее важные характеристики структуры СА. Он представляет собой хорошо растворимый стабильный глобулярный белок, который принадлежит к мультисемейству, включающему в себя также α -фетопротейин, группоспецифический компонент, витамин D-связывающий белок. СА синтезируется и секретируется в печени (Peters, 1996). Он импортируется в эндоплазматический ретикулум, где происходит отщепление его N-концевого препропептида с помощью сериновой протеиназы, после чего белок транспортируется в аппарат Гольджи, а далее возможны его посттрансляционные модификации. Например, в настоящее время обнаружено, более 60 структурных изоформ СА, среди которых существуют также N-гликозилированные варианты. Вторичная структура альбумина характеризуется преобладанием α -спиралей – около 50–67%. Между остатками цистеина образуется 17 дисульфидных связей, формирующих 9 петель. Каждая три петли организуют глобулярную структуру, центральная часть которой сформирована гидрофобными остатками аминокислот, а внешняя – гидрофильными. Такая структурная единица альбумина называется доменом. СА у разных видов животных и человека характеризуются высокой степенью гомологии: они могут отличаться лишь числом доменов и некоторыми аминокислотными остатками. Молекула СА млекопитающих состоит из трех доменов, каждый из которых содержит 10 α -спиралей и подразделяется на 2 субдомена. Методами кристаллографии было установлено, что полипептидная цепь альбумина образует ассиметричную глобулу в форме сердца с размерами приблизительно $80 \times 80 \times 30 \text{ \AA}$. Несмотря на большое количество дисульфидных связей, молекула

альбумина демонстрирует значительную гибкость, ее петли могут смещаться друг относительно друга. Это позволяет ей совершать обратимые конформационные перестройки при различных воздействиях (Peters, 1996).

СА проявляют антиоксидантные свойства, которые очень важны для поддержания осмотического давления плазмы и внутритканевого движения жидкости. Они осуществляют питательную функцию, являются резервом аминокислот для синтеза белков. Тем не менее, их важнейшей функцией в организме является обратимое связывание и транспорт различных низкомолекулярных эндогенных и экзогенных веществ, причем как гидрофильных, так и гидрофобных – аминокислот, метаболитов, гормонов, холестерина, жирных кислот, билирубина, солей желчных кислот, солей тяжелых металлов, лекарственных препаратов, красителей и многих других (Peters, 1996; Kragh-Hansen et al., 2013).

При связывании лигандов в молекуле альбумина происходят конформационные перестройки. Они могут быть довольно значительными, например, увеличение или уменьшение количества α -спиралей. Эти перестройки так же, как и способность молекулы колебаться между изомерными формами в водном растворе, вероятно, обуславливают появление новых мест связывания лигандов различной природы. Также при воздействии ряда физико-химических факторов, таких как температура, изменение pH и ионной силы раствора, присутствие лигандов, присоединение разных химических групп, возможно изменение первичной, вторичной и третичной структуры альбумина (Peters, 1996).

Гибкость молекулы СА и ее чрезвычайная конформационная лабильность создают предпосылки для аллостерических влияний со стороны разнообразных соединений на связывание лигандов с белком. К тому же эти аллостерические взаимодействия вовлечены в формирование новых центров связывания лигандов. Кроме того, на связывание тех или иных лигандов с молекулой СА оказывает влияние наличие единичных или нескольких мутаций в самой молекуле альбумина. Этот факт был установлен при исследовании генетически детерминированного полиморфизма альбумина человека (Peters, 1996; Kragh-Hansen et al., 2013).

Установление первичной структуры молекулы альбумина позволило получить точную информацию о локализации некоторых связывающих участков и выявить тонкие структурные механизмы их взаимодействия с различными веществами. В результате взаимодействия с разнообразными лигандами молекула альбумина претерпевает изменения, которые зависят от химических свойств связываемых веществ и характера образующих

Таблица 2. Структурные группы альбуминов, входящих в состав МГТБ, выделенных из различных тканей *Bos taurus*

Источник альбумина	Номер белка в базе данных	Положение аминокислоты в полипептидной цепи альбумина
Сыворотка крови, стекловидное тело, склера, цилиарное тело, радужка, пещеристое тело, яичники	gi 1351907	Glu116 Ala 214 Ala 429 Asp 579
ПЭ, роговица, зрительный нерв	gi 36746020	Glu116 Thr 214 Ala 429 Asp 579
Передняя камера глаза	gi 74267962	Ala 116 Thr 214 Glu 429 Gly 579

Примечание: жирным шрифтом показаны положения в цепи альбумина *Bos taurus*, в которых аминокислоты отличаются от gi|1351907 в разных тканях.

связей. При этом происходят изменения физико-химических свойств как белка, так и самих лигандов, следствием чего может быть или ослабление, или же усиление действия лекарственных веществ в организме или же проявление биологической активности у белка и лигандов после их взаимодействия (Kragh-Hansen et al., 2013). На наш взгляд, обнаруженные в различных тканях животных МГТБ можно привести в качестве примера возникновения специфической активности у БПК, которые образовались в результате взаимодействия СА и лигандов, которые в данном случае представлены пептидами – продуктами протеолиза адгезивных и мембранных белков, функционирующих в соответствующих тканях (Ильина и др., 2011; 2019). В связи с этим было предпринято детальное изучение свойств альбуминов, содержащихся в БПК биорегуляторов группы МГТБ, выделенных из тканей быка и крысы.

ИЗУЧЕНИЕ СОСТАВА МГТБ И СТРУКТУРЫ ИХ ОТДЕЛЬНЫХ КОМПОНЕНТОВ

С помощью метода PMF (peptide mass fingerprinting) было установлено, что альбумины входящие в состав МГТБ, выделенных из ряда тканей быка, соответствуют трем изоформам СА *Bos taurus* по базе данных NCBI (National Center for Biotechnology Information). Данные альбумины отличаются друг от друга составом аминокислот только в четырех положениях полипептидной цепи – 116, 214, 429 и 579 (табл. 2). Аналогичным способом был проведен сравнительный анализ триптических фрагментов альбуминов, выделенных из различных тканей крысы Wistar. Было установлено, что данные альбумины отличаются друг от друга тремя заменами аминокислот полипептид-

ной цепи, соответственно, в положениях 262, 317 и 431 (табл. 3). Установленные замены аминокислот в первичной последовательности СА, входящих в состав МГТБ, выделенных из тканей КРС и крысы расположены во втором и третьем домене его молекулы. Такая корреляция замены аминокислот в первичной последовательности альбуминов может объяснить их способность, как белков-модуляторов, различным образом изменять активность полипептидов МГТБ. Например, в сыворотке крови взаимодействие с белком-модулятором (СА) обратимо ингибирует биологическую активность регуляторных пептидов, а в тканях заднего отдела глаза (пигментный эпителий, радужка, стекловидное тело, цилиарное тело) белки-модуляторы усиливают биологическое действие полипептидов МГТБ (Ямскова и др., 2012).

В состав МГТБ, полученных из ткани каждого отдельного органа млекопитающих, входит определенный набор пептидов, характеризующихся постоянством их количества, а также значений молекулярных масс (табл. 1) (Ильина и др., 2011). Было показано высокое сродство пептидов, именно к “своей” изоформе СА – альбумин “не отдает свои пептиды” даже в условиях длительной обработки БПК смесью дезагрегирующих, хаотропных агентов, органических растворителей (Сидорский и др., 2018). Более того, взаимодействие с пептидами стабилизирует конформацию альбумина в таком БПК, при нарушении этого взаимодействия белок необратимо денатурирует. Важно, что интервакулярный СА – коммерческий препарат из сыворотки крови, не образовывал с пептидами биологически активные БПК (Yamskova et al., 2007).

Подробное исследование вторичной и третичной структур БПК было проведено на примере

Таблица 3. Структурные группы альбуминов, входящих в состав МГТБ, выделенных из различных тканей крысы Wistar

Источник альбумина	Номер белка в базе данных	Положение аминокислоты в полипептидной цепи альбумина
Сыворотка крови, мозг	gi 124028612	Val 262 Ile 317 Val 431
Легкое	gi 158138568	Leu 262 Thr 317 Ile 431
Печень	gi 55628	Val 262 Thr 317 Val 431

Примечание: жирным шрифтом показаны положения в цепи альбумина крысы Wistar, в которых аминокислоты отличаются от gi|124028612 в разных тканях.

МГТБ из склеры глаза быка (Сидорский и др., 2018; Pyina et al., 2020). Как и все другие биорегуляторы данной группы, выделенные из тканей млекопитающих, МГТБ из склеры глаза представляет собой БПК, состоящий из изоформы СА gi|1351907 и набора определенных пептидов (Ильина и др., 2011, 2019). С помощью методов УФ-, КД-спектроскопии и динамического светорассеяния было изучено влияние температуры и хаотропных агентов на пространственную организацию БПК, входящего в состав данного МГТБ и представляющего его основу. Было установлено, что БПК обладает высокой конформационной термостабильностью. Определена точка конформационного термоперехода, после которой БПК переходит в устойчивое денатурированное состояние.

В водных растворах МГТБ, выделенные из разных тканей животных, образуют термостабильные наноразмерные частицы и проявляют свойства шаперона – ингибитора агрегации модельных белков, индуцируемой дитиотреитолом (ДТТ). На примере МГТБ из склеры шаперонная активность была достаточно подробно изучена (Сидорский и др., 2018; Pyina et al., 2020). Пространственная структура БПК этого биорегулятора характеризуется наличием α -спирализованной вторичной структуры с точкой конформационного термоперехода в 65°C, что свидетельствует о его значительной стабильности. Установлено, что в водных растворах он образует термостабильные и устойчивые к воздействию хаотропных агентов наноразмерные частицы (приблизительно 100 нм). В то же время пептиды, входящие в состав БПК, стабилизируют молекулу СА, сохраняя его способность к формированию лабильных/подвижных агрегатов (ассоциатов). Данное свойство характерно для молекулярных шаперонов, так как лабильность их олигомеров важна для распознавания и связывания субстратов.

БПК, выделенный из склеры, проявляет свойства шаперона – ингибитора ДТТ-индуцированной агрегации БСА (бычий СА) и лизоцима. Следует отметить, что 100%-ное ингибирование агрегации БСА достигается в 10 раз меньшим количеством БПК, чем ингибирование агрегации лизоцима (Сидорский и др., 2018). Возможно, что стабилизация трехмерной структуры БСА достигается быстрее за счет ее сродства со структурой МГТБ, которое обусловлено взаимодействием их гидрофобных участков. Поскольку механизм действия молекулярных шаперонов основан на их взаимодействии с гидрофобными участками ненативных белков, которое препятствует агрегации этих белков между собой, сохраняя их фолдинг-компетентное состояние, можно предположить, что в физиологических условиях субстрат-связывающие участки альбумина, входящего в состав МГТБ, “спрятаны” внутри мультимера, а повышение температуры вызывает изменение конформации его молекулы, увеличивая доступность гидрофобных участков шаперона и облегчая его связывание с субстратом. Таким образом, МГТБ ингибирует субъединичный обмен между олигомерами агрегирующего белка, проявляя шапероноподобные свойства. На наш взгляд, это важно, поскольку БПК, входящие в состав МГТБ, локализованные внеклеточно, осуществляют контроль за восстановлением правильной нативной третичной или четвертичной структуры белков, а также за образованием и диссоциацией белковых комплексов (Wyatt et al., 2013).

Таким образом, БПК являются основой структуры МГТБ; нам представляется весьма вероятным, что именно с образования БПК начинается “сборка” наноразмерных частиц МГТБ в межклеточном пространстве тканей.

Исследование состава МГТБ показало, что кроме БПК они содержат липиды и углеводы

(Ямсков и др., 2009). После экстракции органическими растворителями фракций МГТБ методом газожидкостной хроматографии были обнаружены остатки таких жирных кислот, как декановая, линолевая, холевая, дезоксихолевая и пальмитиновая. Данные жирные кислоты являются постоянными компонентами многих тканей, в том числе, крови позвоночных животных. Тем не менее, не выясненным остается вопрос: какова их роль в образовании БПК биорегуляторов данной группы, а также в поддержании устойчивых наноразмерных частиц, которые обнаруживаются в растворах МГТБ и от образования которых зависит активность МГТБ (Ямсков и др., 2009). Следует отметить, что в литературе существуют данные, указывающие на значительную роль ненасыщенных жирных кислот в таких важных биологических процессах, как генная экспрессия, клеточная миграция, пролиферация, адгезия и дифференцировка (Lapillonne et al., 2004).

Согласно современным представлениям, большинство лигандов взаимодействуют со своими рецепторами, находящимися на ПМ, по механизму “белок–углеводного узнавания” (Reichardt, 1993). Предполагая, что во взаимодействии с ПМ клетки участвует углеводная детерминанта МГТБ, был изучен ряд различающихся по структуре маннозосодержащих олигосахаридов с помощью адгезиометрического метода, применяемого для биотестирования биорегуляторов данной группы. В этом исследовании была предпринята попытка выявить углеводную компоненту, структура которой наиболее близка по строению к олигоманнозидным цепям МГТБ.

Было показано, что биологически активными являлись структуры $\text{CH}_3\text{-}\alpha\text{Man}$, $\text{CH}_3\text{-}\alpha\text{Gal}$, но не $\text{CH}_3\text{-}\alpha\text{Glu}$. Из маннозосодержащих олигосахаридов биологическую активность проявляли те, терминальные остатки которых были представлены дисахаридом $\text{Man}\alpha 1\text{-}2\text{Man}$ и дисахаридом $\text{Gal}\beta 1\text{-}4\text{GlcNAc}$. Мембранотропная активность этих веществ характеризуется полимодальной дозовой зависимостью, которая сходна с дозовой зависимостью мембранотропной активности МГТБ (Ямскава и др., 2012). Полученные данные указывают на присутствие на поверхности ПМ гепатоцитов сайтов, специфически узнающих маннозо- и галактозосодержащие дисахариды с данными структурами.

Результаты этого исследования согласуются с ранее полученными данными, которые показали, что остатки маннозы, галактозы и N-ацетилглюкозамина играют принципиальную роль в адгезии гепатоцитов *in vitro* (Weigel et al., 1978; Weigel, 1980; Sathyamoorthy et al., 1991). Полученные данные указывают также на присутствие на поверхности ПМ гепатоцитов сайта, узнающего терминальную структуру $\text{Gal}\beta 1\text{-}4\text{GlcNAc}$. Из этих дан-

ных следует, что на поверхности клеток печени присутствуют вещества, содержащие такую олигосахаридную структуру. Это могут быть экспрессируемые гепатоцитами млекопитающих гликопротеины плазмы крови, а также мембраносвязанные гликопротеины печени, в состав которых входят смешанные цепи, содержащие $\text{Gal}\beta 1\text{-}4\text{GlcNAc}$ и GalNAc (Sharon, Lis, 1989).

ЛОКАЛИЗАЦИЯ МГТБ

Важным этапом в разработке экспериментального подхода к исследованию МГТБ явилось установление локализации данных биорегуляторов в тканях позвоночных животных. Проводили это исследование с помощью методов иммуногистохимии, поликлональные антисыворотки получали по методу Гослинга (Immunoassays ..., 2000). Однако получить поликлональные сыворотки у кроликов удалось только в результате многократной иммунизации небольшими объемами концентрированных растворов высокоочищенных фракций МГТБ. Локализацию МГТБ изучали в тканях крысы и тритона, используя иммуногистохимическую реакцию с использованием вторичных FITC-конъюгированных антител (Краснов и др., 2003а).

Было установлено, что МГТБ локализованы в межклеточном пространстве тканей, которые являлись источником их выделения, причем важно, что идентичная локализация была продемонстрирована как для млекопитающих, так и для амфибий. Полученные результаты указывают на тканеспецифический характер распределения биорегуляторов данной группы, несмотря на очевидные различия в первичной структуре белков животных разных классов, в том числе альбуминов сыворотки крови. Например, флуоресценция вторичных FITC-конъюгированных антител при исследовании локализации МГТБ, выделенного из роговицы глаза быка, была обнаружена в межклеточном пространстве эпителия и эндотелия как в роговице глаза тритона, так и глаза крысы. В этом же исследовании было показано, что в роговицах глаз этих видов позвоночных после культивирования в течение 4 сут наблюдалось значительное увеличение интенсивности специфической иммунофлуоресценции в межклеточном пространстве эпителия и эндотелия, по сравнению с интактной роговицей. Причем усиление интенсивности иммунофлуоресценции в межклеточном пространстве эпителия существенно превосходило таковое в межклеточном пространстве эндотелия. Эти данные предполагают увеличение содержания МГТБ в межклеточном пространстве эпителия роговицы после культивирования, которое может быть связано с активацией защитного механизма, направленного на поддержание целостности и сохранения функции имен-

но эпителии как покровной ткани. Аналогичные наблюдения были сделаны при изучении локализации МГТБ, выделенного из сетчатки глаза быка. В этом случае специфическая флуоресценция была обнаружена на поверхности отростков фоторецепторов сетчатки тритона и крысы (Краснов и др., 2003а).

Иммуногистохимическими методами было показано, что биорегулятор, выделенный из коровьего молока, имел пристеночную локализацию, а также обнаруживался во внутреннем просвете протока лактирующей молочной железы крысы (Назарова и др., 2006). Пристеночную локализацию в протоках предстательной железы мыши демонстрировал биорегулятор, выделенный из предстательной железы быка (Nazarova et al., 2007).

Таким образом, полученные результаты показывают, что не только активность, но и локализация МГТБ характеризуется наличием тканевой, но не видовой специфичности. Представляется правомочным такое объяснение этих данных. На гистологических срезах тканей, окрашенных FITC-мечеными вторичными антителами к IgG кролика, которые взаимодействовали с поликлональной антисывороткой кролика к МГТБ, выделенному из ткани быка, показана внеклеточная локализация комплекса антиген–антитело на протяжении всей поверхности клеток. Это свидетельствует об идентичности определенных эпитопов молекул биорегулятора у животных разных видов, поэтому антитела, полученные на МГТБ, выделенных из определенной ткани быка, могут связываться с соответствующими антигенами (биорегуляторами) в той же ткани другого вида животного, например, у тритона или мыши. Из литературы известно, что гомология между СА человека и быка составляет 76%, а человека и крысы – 73%.

БИОЛОГИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ МГТБ

В экспериментальных сериях, проведенных в условиях *in vivo*, удалось продемонстрировать специфическую активность МГТБ, выделенных из различных тканей млекопитающих (Казанский и др., 2000; Ямскова и др., 2009а; Константиновский и др., 2012; Ямскова и др., 2012; Vorislenko et al., 2007). Основные исследования, выполненные в этих работах, были проведены на экспериментальных моделях ряда патологий, которые инициировали локальным нанесением травмы (например, хрящевой ткани коленного сустава или роговицы глаза). В отдельных работах применяли специфические токсины, повреждающие соответствующий орган-мишень, например, стрептозотцин, используемый в экспериментальной модели диабета 2-го типа. Было показано, что МГТБ проявляют выраженное

протекторное действие, которое выражается в подержании в тканях-мишенях адгезионных межклеточных взаимодействий, работы основных ферментных систем, в увеличении жизнеспособности клеток, а также в стимуляции процессов регенерации (Ямскова и др., 2012).

Тем не менее, для понимания механизма действия МГТБ продолжала оставаться актуальной разработка экспериментальных моделей *in vitro*. В этом аспекте наше внимание привлекли органотипические культуры ткани, в которых сохранена структура межклеточного пространства. Одной из таких моделей явилась культура заднего отдела глаза позвоночных животных с сохранением адгезионных взаимодействий между сетчаткой, пигментным эпителием, хороидом и склерой, разработанная для изучения МГТБ, выделенных из тканей сетчатки и пигментного эпителия глаза (Краснов и др., 2003б). Добавление в среду культивирования МГТБ, выделенного из сетчатки глаза быка, способствовало сохранению пространственной организации этой ткани и ее адгезии с пигментным эпителием в интерфоторецепторном матриксе, а также увеличению жизнеспособности нейронов. При воздействии МГТБ, выделенного из пигментного эпителия глаза быка, наблюдали стабилизацию адгезии и дифференцировки пигментных клеток. Данный биорегулятор оказывал протекторное действие, выражающееся в достоверном увеличении жизнеспособности биполяров нейтральной сетчатки *in vitro* (Краснов и др., 2003а). В данном исследовании было установлено, что биорегуляторы, выделенные из тканей, имеющих общее происхождение, которые в онтогенезе связаны метаболически и контактируют между собой, оказывают влияние на жизнеспособность, адгезионные свойства клеток различных типов этих тканей, то есть их активность характеризуется наличием тканевой специфичности, что и нашло подтверждение в результатах исследования первичной структуры полипептидных последовательностей этих биорегуляторов (Ильина и др., 2011, 2019).

Наиболее значимые результаты в исследовании активности МГТБ были получены в экспериментах, проведенных на роллерных органотипических культурах *in vitro* (Ямскова и др., 2009а; 2012). В условиях роллерного вращения, при котором обеспечивалось отсутствие адгезии клеток к поверхности сосуда, в тканях органотипических культур происходила дополнительная активация клеточных источников регенерации (Григорян и др., 2005; Victorov, 2001). Эти экспериментальные модели оказались оптимальными для изучения биологического действия МГТБ. Следует отметить, что метод роллерного органотипического культивирования тканей менее распространен по сравнению с методом роллерного клеточного культивирования. Впервые роллерное клеточное

культивирование было предпринято в 50–60-е гг. XX в. на клетках сетчатки глаза куриных эмбрионов (Moscona, 1961; 1963). Значительно позже метод роллерного органотипического культивирования тканей был впервые применен при исследовании ткани эмбриональной сетчатки млекопитающих для биотестирования ряда цитокинов (Victorov, 2001), а также при культивировании сетчатки взрослых тритонов с целью исследования ее регенераторных потенциалов (Григорян и др., 2005). В этих работах было показано, что в данных условиях культивирования происходит накопление малодифференцированных клеток, которые активно пролиферируют и могут быть отнесены к клеточным источникам регенерации в ткани. В условиях отсутствия адгезионного сигнала со стороны подложки в ткани развиваются процессы дедифференцировки клеток, клеточной миграции и пролиферации. Метод роллерного культивирования тканей является эффективным для исследования клеточных источников регенерации в тканях у взрослых особей, по крайней мере, низших позвоночных. В этой связи необходимо отметить, что ткани амфибий, по сравнению с тканями млекопитающих, имеют высокие потенциалы к регенерации, выдерживают большие сроки культивирования, сохраняя жизнеспособность клеток в условиях *in vitro* (Григорян и др., 2005). Для их культивирования не требуется введение в питательную среду различных биологически активных веществ, которые могут повлиять на активность МГТБ. Были разработаны органотипические культуры таких тканей тритона *Pleurodeles waltl*, как печень, кожа, регенерат хвоста, отдельные структуры глаза, а также целый глаз (Ямскова и др., 2012).

В этих экспериментальных сериях было установлено, что МГТБ оказывают влияние на дифференцировку, увеличивают жизнеспособность клеток, способствуют сохранению структуры ткани и поддерживают в ней межклеточные адгезионные взаимодействия (Ямскова и др., 2012). Важно, что в этих исследованиях было продемонстрировано наличие тканеспецифического, но не видоспецифического, характера биологического действия МГТБ. Так, например, биорегулятор, выделенный из хрусталика глаза быка, способствовал сохранению прозрачности хрусталиков глаза быка, лягушки, крысы, человека (Краснов и др., 2005; Krasnov et al., 2007).

Исследование МГТБ, выделенного из склеры глаза быка, было проведено с применением трех новых экспериментальных моделей *in vitro*: роллерного культивирования ткани склеры, культуры заднего отдела глаза, а также впервые проведенного роллерного культивирования целого глаза тритона (Ямскова и др., 2010а). Было установлено, что модель стационарного (на фильтрах) органотипического культивирования склеры в составе

заднего сектора глаза, а также модель роллерного культивирования целого глаза тритона *Pl. waltl* оказались наиболее эффективными для изучения специфического действия данного МГТБ. На этих экспериментальных моделях удалось выявить протекторное действие биорегулятора, которое выражалось в увеличении жизнеспособности фибробластов склеры, поддержании пространственной организации коллагеновых волокон, а также в способности поддерживать адгезию между тканями заднего отдела глаза и стимулировать статус клеточной дифференцировки ПЭ (Сидорский и др., 2018).

Большое исследование было проведено на роллерной органотипической культуре роговицы глаза тритона (Маргасюк и др., 2008). В этой работе было показано, что при отсутствии адгезионного сигнала (роллерном культивировании) в ткани активируются клеточные источники регенерации — стволовые клетки лимба и стромы, а в присутствии биорегулятора, выделенного из роговицы глаза быка, наблюдается дополнительная их активация (Маргасюк и др., 2008). Здесь следует отметить, что роговица является уникальным объектом исследования клеточного резервного отдела в системах *in vitro*. Исследование лимба — области, расположенной на границе роговицы и склеры — как источника клеток, участвующих в возобновлении и регенерации слоев роговицы была показана в начале 1970-х гг., а поиск веществ, оказывающих влияние на прогениторные клетки области лимба, по-прежнему является актуальным направлением современных биологических исследований (Davanger, Evenson, 1971; Cot-sarelis et al., 1989). В зависимости от способа выделения роговицы из глаза (с сохранением области лимба или без данной области) роговица сохраняет либо один (только базальный слой эпителия роговицы), либо два (базальный слой эпителия роговицы и область лимба) клеточных источника регенерации. В связи с этим в эксперименте для культивирования использовали роговицы с сохраненной областью лимба или без данной области. Кроме того, сравнивали состояние роговиц, культивируемых в стационарных условиях и при роллерном вращении. Для оценки состояния роговицы морфометрически оценивали относительную толщину эпителия и стромы.

В результате проведенного исследования было сделано несколько важных выводов. Во-первых, было показано, что в отличие от культивирования на подложке (наличие адгезионного сигнала), роллерный тип культивирования роговицы глаза амфибий способствует активации клеток резервного отдела. Во-вторых, в роговице амфибий влияние биорегулятора выражалось в стимуляции как недифференцированных клеточных источников регенерации — клеток лимба, так и более дифференцированных тканевых прогениторных кле-

ток – клеток базального слоя. В-третьих, в условиях роллерного культивирования роговицы глаза крысы биорегулятор не оказывал влияния на клеточные источники регенерации ткани (клетки лимба), но действовал на клетки базального слоя роговицы, интенсифицируя их переход в дифференцированные эпителиальные клетки (Маргасюк и др., 2008). Способность МГТБ дополнительно активировать клеточные источники в ткани и стимулировать тем самым процессы восстановления и регенерации были показаны и в других экспериментах.

На модели органотипического культивирования предстательной железы мыши *in vitro* была изучена специфическая активность МГТБ, выделенного из ткани предстательной железы быка (Nazarova et al., 2007). При вращении в роллере культивировали отдельно половинки простаты мыши в течение 24 ч. В контроле в ткани железы наблюдали значительную гибель клеток секреторного эпителия и отсутствие выработки секрета. Тем не менее ткань оставалась жизнеспособной (особенно в краевых зонах), сохранялась структура отдельных желез и протоков. При воздействии МГТБ, выделенного из предстательной железы, наблюдали совершенно иную картину: в ткани происходила активная выработка секрета. Отмечалась стимуляция секреторной функции эпителиальных клеток простаты: она оказалась настолько интенсивной, что приводила к истощению и гибели секреторных клеток в условиях органного культивирования железы *in vitro*. Таким образом, в данном исследовании была продемонстрирована способность МГТБ кроме поддержания структуры ткани, межклеточных адгезионных взаимодействий и жизнеспособности клеток, стимулировать секреторную функцию железы (Nazarova et al., 2007).

На органной культуре печени тритона было изучено специфическое действие МГТБ, выделенных из печени и желчи быка (Vorisenko et al., 2007). Было показано, что только при роллерном способе культивирования ткани МГТБ, выделенный из печени, способствовал увеличению площади кластеров пигментированных клеток печени тритона – аналогов клеток Купфера печени млекопитающих, но в то же время угнетал пролиферативную активность клеток кроветворения в краевой зоне по сравнению с контролем. Влияние МГТБ, выделенного из желчи, выразилось в уменьшении площади кластеров пигментированных клеток и в ингибировании пролиферативной активности кроветворных клеток в краевой зоне, по сравнению с контролем. Полученные результаты показывают, что данные МГТБ, несмотря на то, что источником их биосинтеза является печень, представляют собой разные вещества, которые различным образом влияют на клетки печени хвостатых амфибий. В этой работе было также

продемонстрировано тканеспецифическое действие МГТБ. Эти данные подтвердили результаты ранее проведенного сравнительного исследования МГТБ, выделенных, соответственно, из ткани нейральной сетчатки и пигментного эпителия глаза млекопитающих (Краснов и др., 2003). В этом исследовании было показано, что несмотря на общее происхождение обеих тканей в эмбриогенезе из нейроэпителия, а также контактного взаимодействия и общего метаболизма в постнатальном периоде, оба МГТБ отличаются структурно и функционально. (Краснов и др., 2003а; Ямскова и др., 2009; Ильина и др., 2011). Биорегулятор из пигментного эпителия поддерживал жизнеспособность биполярных клеток и отростков Мюллеровской глии, а также дифференцированное состояние клеток пигментного эпителия и влиял на сохранение адгезии между сосудистой оболочкой глаза и сетчаткой. Биорегулятор из сетчатки действовал на жизнеспособность самих клеток Мюллера и фоторецепторов сетчатки. Биорегулятор из пигментного эпителия обладал сосудосуживающим, а биорегулятор из сетчатки – сосудорасширяющим действием.

Наиболее изученным является МГТБ, обнаруженный в сыворотке крови позвоночных животных, который у взрослых особей находится в неактивном состоянии (Ямскова, Резникова, 1991). Как и все МГТБ, этот биорегулятор представляет собой БПК, образованный сывороточным альбумином и определенным набором пептидов (Ильина и др., 2011; 2019). В сыворотках крови взрослых особей и эмбрионов млекопитающих этот биорегулятор находится в различном состоянии: во всем постнатальном периоде – в неактивном состоянии из-за образования комплекса с белком-инактиватором, а в первые две трети эмбрионального развития МГТБ присутствует в сыворотке крови в активном состоянии. Было показано, что инактивация данного МГТБ в последней трети эмбриогенеза происходит постепенно: в течение этого периода наблюдалось снижение его активности до полной инактивации к моменту рождения особи (Ямскова, Резникова, 1991). Было сформулировано предположение о том, что МГТБ из сыворотки крови играет важную роль в эмбриональном развитии млекопитающих, а во всем постнатальном периоде присутствует в сыворотке в неактивном состоянии, образование которого представляется оптимальным способом депонирования этого биологически активного вещества в организме.

Исследование влияния сывороточного биорегулятора на культуру фибробластов млекопитающих *in vitro* продемонстрировало его рост-стимулирующее действие (Бувверова и др., 1985). Было установлено, что биорегулятор стимулирует пролиферацию фибробластов млекопитающих только в лог-фазе, то есть при условии восстановления

адгезии клеток к подложке и формирования их межклеточных взаимодействий. Эти данные указывают на присутствие на поверхности определенных сайтов связывания с МГТБ. В отличие от клеток, находящихся в лог-фазе роста, клетки, обработанные трипсином при пересеве и помещенные в среду, содержащую МГТБ, не были способны к взаимодействию с ним. Полученные результаты показывают, что данный биорегулятор стимулирует пролиферативные свойства фибробластов в лог-фазе, когда происходит восстановление белков клеточной поверхности, нарушенных при обработке трипсином. Аналогичные данные были получены в той же экспериментальной серии при изучении влияния МГТБ из сыворотки на клонирование фибробластов *in vitro*: для проявления его биологического действия необходимо было сохранение поверхностных белков клеток (Буеверова и др., 1985). При исследовании активности других МГТБ была также продемонстрирована необходимость сохранения белкового состава поверхности клеток-мишеней (Ямскова и др., 1990).

Таким образом, в исследовании, проведенном на монослойной культуре фибробластов млекопитающих, была установлена способность МГТБ, выделенного из сыворотки крови, оказывать влияние на адгезивные и пролиферативные свойства этих клеток *in vitro*.

МГТБ из сыворотки крови стимулировал ранозаживление поврежденной роговицы у кроликов *in vivo* (Константиновский и др., 2012), кожных ран у мышей *in vivo* (Стрецкий и др., 2011), стимулировал процессы остеогенеза при повреждении хрящевой и костной тканей у крыс *in vivo* и *in vitro* (Рыбакова и др., 2009, 2014; Шайхалиев и др., 2013, 2019). Во всех этих экспериментах была отмечена способность МГТБ из сыворотки не только активировать процессы заживления экспериментальных ран, но и стимулировать процессы восстановления по механизму эпиморфной регенерации (Ямскова и др., 2010б). Например, в опытах, проведенных на модели экспериментальной кожной раны у мышей *in vivo* было показано, что МГТБ дополнительно активирует стволовые ниши волосяного фолликула, а также прогениторные клетки эпидермиса, в результате чего наблюдается восстановление структуры ткани кожи, вплоть до потовых и сальных желез и мышечных волокон (Стрецкий и др., 2011).

На моделях повреждения костной ткани у крыс *in vivo* было показано, что данный МГТБ способствовал быстрому восстановлению экспериментального дефекта кости, а также вызывал восстановление хрящевой ткани. При включении МГТБ, выделенного из сыворотки крови, в различные композиции — хитозановый гель, содержащий гидроксипапатит, или же в криогелевые

конструкции на основе альбумина или альгината, не зависимо от материала их основы, — во всех случаях отмечалась активная репарация кости (Шайхалиев и др., 2013, 2019; Краснов и др., 2019). Именно за счет действия биорегулятора, начиная с 7–14-х сут после операции, в области дефекта наблюдали восстановление плотной костной ткани и остеонив, формирование костного мозга. Через 14 дней после операции отмечалось заполнение свободного пространства в полости дефекта регенерирующей костной тканью, а к 30-м сут — полное восстановление гистоструктуры по механизму эпиморфной регенерации. На ранних сроках у животных контрольных групп (без воздействия биорегулятора) отмечали формирование плотной волокнистой ткани и губчатой кости, а на поздних сроках — заполнение дефекта соединительно-тканевыми элементами (Шайхалиев и др., 2013, 2019; Краснов и др., 2019).

На новой модели органотипического культивирования регенератов хвостов взрослых тритонов *Pleurodeles waltl* было показано, что биорегулятор, выделенный из сыворотки крови, проявлял морфогенетическое действие в концентрации, соответствующей 10^{-4} мг белка/мл, которое выражалось в сохранении хрящевой и мышечной тканей регенерата, а также структуры кожи и подкожных желез. Полученные результаты согласуются с ранее полученными данными, которые показали, что данный МГТБ в высокой концентрации стимулировал регенерацию конечности у лягушки *Xenopus laevis in vivo* (Тучкова и др., 1992; Aguillon-Gutierrez et al., 2020). Действие МГТБ, выделенного из костной ткани млекопитающих (крыса, бык), было иным: он тканеспецифично увеличивал жизнеспособность клеток хрящевой ткани и способствовал поддержанию ее структуры. При его воздействии наблюдали полностью сохраненную структуру хрящевой ткани, отсутствие гибели клеток, а также начало сегментации хряща, характерное для данной стадии его развития. Под многослойным эпителием в кориуме были обнаружены зрелые железы с секретом, пигментированные клетки, в отличие от контрольной серии (без воздействия МГТБ из костной ткани), где были отмечены развитие процессов деградациии ткани и массовая гибель клеток. Следует отметить, что в этом исследовании было установлено, что МГТБ, выделенный из костной ткани млекопитающих, проявлял протекторное действие только в низких концентрациях, соответствующих 10^{-11} – 10^{-14} мг белка/мл; в более высоких концентрациях, соответствующих 10^{-3} – 10^{-7} мг белка/мл, этот биорегулятор не был активен. Концентрационную зависимость биологического действия МГТБ отмечали во многих экспериментах: биорегуляторы этой группы оказывали протекторное действие на ткань, вызывали увеличение жизнеспособности клеток в условиях *in vitro*,

а также демонстрировали свое ранозаживляющее свойство в условиях *in vivo*, только в очень низких концентрациях (Ямскова и др., 2009, 2012).

Таким образом, экспериментальные серии, проведенные по исследованию биологического действия МГТБ, выделенных из различных тканей животных, показали, что биорегуляторы этой группы оказывают влияние на свойства ПМ клеток, способствуют поддержанию межклеточных адгезионных взаимодействий в тканях. МГТБ также способны стимулировать регенерацию и процессы восстановления в патологически измененных (травмированных) тканях за счет дополнительной активации клеточных источников регенерации в тканях. Их биологическая активность характеризуется наличием тканеспецифического, но не видоспецифического действия. Следует также отметить, что свое специфическое действие биорегуляторы данной группы проявляют в низких концентрациях. Эти данные предполагают существование в тканях позвоночных животных ранее не изученного механизма проведения регуляторного сигнала, в котором важнейшая роль отводится биологическим жидкостям, а вода является матрицей для передачи информации (Ямскова, Ямсков, 1999; Babushkina et al., 2005).

МЕХАНИЗМ БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ МГТБ

На основании полученных результатов было сформулировано предположение о том, что механизм биологического действия МГТБ обусловлен их мембранотропной активностью, то есть способностью изменять вязкоупругие свойства ПМ клеток (Ямскова, Резникова, 1979). Позднее, при исследовании проницаемости ПМ гепатоцитов крыс было установлено, что в присутствии МГТБ наблюдается ее изменение для H^3 -лейцина (Ямскова и др., 1994).

Было установлено, что мембранотропная активность биорегуляторов этой группы проявлялась только в условиях сохранения целостности структуры межклеточного пространства ткани (Ямскова и др., 1990, 1994). Например, МГТБ не влияли на свойства ПМ гепатоцитов на модели суспензионных культур, а также органной культуры печени млекопитающих, предварительно перфузированной физиологическим раствором, содержащим ионы кальция (Ямскова и др., 1990, 1994). Эти данные позволяют предположить существование в межклеточном пространстве тканей животных определенной супрамолекулярной структуры, выполненной сложными ансамблями МГТБ, основной функцией которой является участие в адгезионном процессе, а именно в обеспечении строго определенного позиционного распределения на поверхности клетки молекул адгезии, сопряженных с путями регуляторной

трансдукции, обеспечивающей распространение по ткани и проведение информационного сигнала в клетку (Напсоск, 2005) Такая структура была названа “малый матрикс” (Ямскова, Ямсков, 1999).

Как показывают результаты проведенных в последние десятилетия исследований механизмов, лежащих в основе процессов регуляторной трансдукции, важнейшая роль в их осуществлении отводится механическим свойствам таких структур, как ПМ, ВКМ (внеклеточный матрикс), цитоскелет, ядерная ламина. С одной стороны, эти супрамолекулярные структуры участвуют в процессах клеточной адгезии, формообразования, а, с другой, — являются участниками путей проведения регуляторного сигнала (Vining, Mooney, 2017; Smith et al., 2018). Именно такое сопряжение составляет основу регуляции всех основных биологических процессов. Эти супрамолекулярные структуры межклеточного пространства и клетки имеют определенную архитектуру, которая может изменяться в зависимости от воздействия различных физико-химических факторов. Все эти структуры связаны между собой в единую интегральную систему, пронизывающую все ткани организмов. Эта интегральная тканевая система (ИТС) исключительно динамична, она может изменяться в отдельных областях, и это изменение за счет перестройки ее архитектуры будет распространяться по всей ИТС. Поэтому изменение пространственной организации, например, ВКМ, сразу будет воспринято другими структурами ИТС, вплоть до ядерной ламина, что, в свою очередь, вызовет изменение в работе генетического аппарата и приведет к соответствующим изменениям в направленности биологического процесса (Bissel et al., 1982). Постоянно существующая динамика процессов клеточной адгезии, обусловленная изменением химического состава внутренней среды организма, а также физических параметров среды обитания организма, приводит к постоянно возникающему “ответу” организма на эти изменения. На наш взгляд, изменение свойств ИТС является основным механизмом эпигенетической регуляции биологических процессов. В свете этих предположений ПМ занимает особое место в пространственной организации ИТС, поскольку ее роль в “дирижировании” процессами регуляторной трансдукции принципиальна. Это связано с местоположением ПМ — она принадлежит одновременно внеклеточному и внутреннему пространству клетки, и именно в ПМ локализованы молекулы, воспринимающие внеклеточные регуляторные сигналы, и берут начало регуляторные пути. Поэтому состояние липидного слоя ПМ исключительно важно для осуществления лигандо-рецепторного взаимодействия, которое является началом (триггером) прохождения любого регуляторного сигнала в

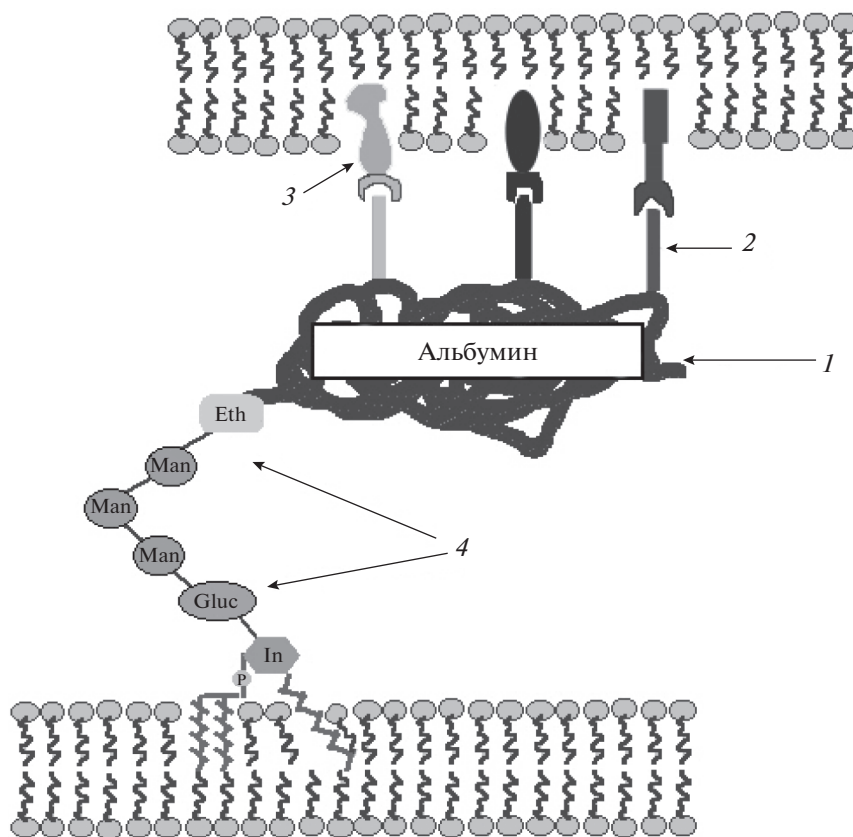


Рис. 1. Предполагаемая схема взаимодействия молекулы альбумина, входящего в состав наноразмерных частиц МГТБ, с ПМ двух контактирующих клеток.

1 – альбумин (изоформа), функционирует как шаперон; 2 – пептиды, которые являются продуктами протеолиза адгезивных белков и сохраняют способность взаимодействия с рецепторами; 3 – рецепторы к адгезивным и мембранным белкам, которые подверглись протеолитическому гидролизу; 4 – мембранный якорь (например, фосфатидилинозитольный) с олигосахаридным кором, к которому через С-концевой домен присоединен сывороточный альбумин (изоформа).

клетку. Изменение конформации рецептора, разрешающее взаимодействие с ним лиганда, является ключевым событием, регулирующим прохождение внутриклеточного сигнала по принципу “да–нет”. Этот механизм особо важен в работе ниш стволовых клеток, регуляция которых формирует основу для регенеративных процессов организма. Состояние ПМ определяется не только составом (строением) липидов, но и латеральной подвижностью липидов и мембранных белков. МГТБ, влияющие на вязкоупругие свойства ПМ и изменяющие ее проницаемость, участвуют в процессах регуляторной трансдукции, “разрешая” прохождение регуляторного сигнала по тому или иному пути.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Существует предположение, что МГТБ участвуют в гетерофилическом молекулярном механизме клеточной адгезии, а биологически активные пептиды, входящие в состав МГТБ, являются про-

дуктами протеолиза компонентов межклеточного пространства, в том числе адгезивных белков, белков ВКМ, которые постоянно обновляются за счет работы ферментов межклеточного пространства, например, матричных металлопротеаз (Lemaître, D’Armiento, 2006). При этом образовавшиеся в результате протеолиза пептиды могут сохранить специфическое связывание с соответствующими рецепторами ПМ. Входящий в состав МГТБ альбумин, действуя как внеклеточный шаперон, организует пептиды в качестве таких специфических лигандов (Marini et al., 2005, Wyatt et al., 2013). Согласно этим представлениям, СА является компонентом межклеточного пространства тканей и участвует в процессах клеточной адгезии. Предполагается, что С-конец СА может быть связан с системой мембранного (например, фосфатидилинозитольного) якоря, который имеет сложное строение и включает олигосахаридный кор, содержащий маннозид, глюкозамин, фосфоэтанолламин, а также собственно инозитольный якорь с жирными кислотами, с помощью которого

БПК взаимодействует с бислоем ПМ клетки (рис. 1). Кроме того, в состав МГТБ входят липиды, которые, с одной стороны, могут способствовать поддержанию определенной конформации сформировавшегося БПК, а, с другой, — участвовать в образовании крупных наноразмерных частиц МГТБ, которые необходимы для проявления их активности. На наш взгляд, представленная на рис. 1 схема наиболее полно объясняет экспериментальные данные, полученные при изучении свойств, локализации и характера биологической активности МГТБ. Здесь следует также учесть, что на рис. 1 показано взаимодействие с ПМ одного БПК, входящего в состав крупных наноразмерных частиц биорегуляторов. БПК в наночастицах взаимодействуют между собой и с пептидами, формируя определенную архитектуру строения образовавшихся супрамолекулярных структур. Именно, такое состояние биорегуляторов определяет их биологическое действие.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бувверова Э.И., Брагина Е.В., Резникова М.М. и др. Действие адгезионного фактора сыворотки крови на пролиферацию клеток млекопитающих *in vitro* // ДАН СССР. 1985. Т. 281. № 1. С. 158–160.
- Григорян Э.Н., Краснов М.С., Алейникова К.С. Ротационное культивирование изолированной сетчатки тритона как способ получения малодифференцированных, пролиферирующих клеток *in vitro* // ДАН. 2005. Т. 405. № 4. С. 566–570.
- Ильина А.П., Куликова О.Г., Мальцев Д.И. и др. Идентификация новых пептидов из межклеточного пространства методом MALDI-TOF масс-спектрометрии // Прикл. биохим. микробиол. 2011. Т. 47. № 2. С. 135–140.
- Ильина А.П., Молявка А.А., Ямскова В.П. и др. Исследование структуры биорегулятора, выделенного из головного мозга крыс // Прикл. биохим. микробиол. 2014. Т. 50. № 4. С. 442–448.
- Ильина А.П., Сидорский Е.В., Елистратов П.А. и др. Анализ изоформ альбумина сыворотки, входящих в состав мембранотропных гомеостатических тканеспецифических биорегуляторов, выделенных из различных тканей млекопитающих // Прикл. биохим. микробиол. 2019. Т. 55. № 4. С. 350–355.
- Казанский Д.Б., Анфалова Т.В., Хромых Л.М. и др. Регуляция иммунитета Т-лимфоцитами: роль низкомолекулярных адгезивных гликопротеинов тимуса // Онтогенез. 2000. Т. 31. № 4. С. 276–277.
- Константиновский А.А., Краснов М.С., Ямскова В.П. и др. Исследование ранозаживляющего действия биорегуляторов, выделенных из тканей глаза и сыворотки крови быка, на модели экспериментальной травмы роговицы у кроликов *in vivo* // БЭБМ. 2012. № 2. С. 177–182.
- Краснов М.С., Григорян Э.Н., Ямскова В.П. Регуляторные белки тканей глаза позвоночных // Радиацион. биол. радиоэкол. 2003а. № 3. С. 265–268.
- Краснов М.С., Григорян Э.Н., Ямскова В.П. Модель органотипического культивирования сетчатки вместе с тканями заднего сектора глаза тритона для изучения действия адгезивных гликопротеинов // Изв. АН. Серия биол. 2003б. № 1. С. 22–36.
- Краснов М.С., Гурмизов Е.П., Ямскова В.П. и др. Исследование влияния регуляторного белка, выделенного из хрусталика глаза быка, на катарактогенез у крыс *in vitro* // Вестн. офтальмол. 2005. Т. 121. № 1. С. 37–39.
- Краснов М.С., Шайхалиев А.И., Коршаков Е.В. и др. Индукция остеогенеза костной ткани крысы с использованием криогенно-структурированных пористых 3D-материалов с содержанием биорегулятора // БЭБМ. 2019. Т. 168. № 7. С. 113–117.
- Маргасюк Д.В., Краснов М.С., Ямсков И.А. и др. Роль регуляторного белка, выделенного из роговицы глаза быка, в активации клеточных источников регенерации роговицы *in vitro* // Изв. РАН. Сер. биол. 2008. № 6. С. 736–745.
- Назарова П.А., Краснов М.С., Ямскова В.П. Регуляторный белок, выделенный из молока крупного рогатого скота // Прикл. биохим. микробиол. 2006. Т. 42. № 5. С. 529–533.
- Рыбакова Е.Ю., Краснов М.С., Ильина А.П. и др. Влияние биорегуляторов, выделенных из сыворотки крови и костной ткани млекопитающих, на состояние регенератов хвостов тритонов при роллерном органотипическом культивировании *in vitro* // Фундам. исслед. 2014. № 5. С. 283–289.
- Рыбакова Е.Ю., Краснов М.С., Ямскова В.П. и др. Новый биорегулятор, выделенный из костной ткани крыс: физико-химические свойства, влияние на хрящевую ткань *in vitro* // ДАН. 2009. Т. 427. № 1. С. 136–138.
- Сидорский Е.В., Ильина А.П., Краснов М.С. и др. Физико-химические свойства и биологическая активность пептидно-белкового комплекса из ткани склеры глаза быка // Прикл. биохим. микробиол. 2018. Т. 54. № 1. С. 82–88.
- Стрецкий Г.М., Краснов М.С., Рыбакова Е.Ю. и др. Исследование влияния композиции на основе хитозанового геля и биорегулятора сыворотки крови на заживление гнойных ран у мышей // Клет. технол. биол. мед. 2011. № 4. С. 211–214.
- Тучкова С.Я., Ямскова В.П., Резникова М.М. Действие 6-Д полипептида из сыворотки крови млекопита-

- ющих на регенерацию передней конечности у шпорцевых лягушек // Онтогенез. 1992. Т. 23. № 3. С. 319–320.
- Шайхалиев А.И., Краснов М.С., Вахрушев И.В. и др. Влияние биоактивного пептидного комплекса, выделенного из сыворотки крови быка, на пролиферацию и миграцию МСК *in vitro*, а также на восстановление костных дефектов *in vivo* // Клет. техн. биол. мед. 2019. № 3. С. 213–220.
- Шайхалиев А.И., Стрецкий Г.М., Краснов М.С. и др. Действие новых композиций на восстановление костных дефектов у крыс в эксперименте // Фундам. иссл. 2013. № 9. Ч. 2. С. 271–276.
- Ямсков И.А., Благодатских И.В., Краснов М.С. и др. Физико-химические свойства биологически активных в микродозах регуляторных белков, выделенных из различных тканей млекопитающих // Изв. РАН. Сер. хим. 2009. № 3. С. 623–628.
- Ямскова В.П. Роль ионов кальция в стабилизации адгезионного фактора печени крыс // Биофизика. 1978. Т. 23. С. 428–432.
- Ямскова В.П., Резникова М.М. Роль макромолекулярных компонентов клеточной поверхности в специфической адгезии клеток // Успехи биол. химии. 1979. Т. 20. С. 95–112.
- Ямскова В.П., Резникова М.М. Низкомолекулярный полипептид сыворотки крови теплокровных: влияние на клеточную адгезию и пролиферацию // Журн. общ. биол. 1991. Т. 52. № 2. С. 181–191.
- Ямскова В.П., Ямсков И.А. Механизм биологического действия физико-химических факторов в сверхмалых дозах // Рос. хим. журн. (ЖРХО им. Д.И. Менделеева). 1999. Т. 43. № 2. С. 74–79.
- Ямскова В.П., Краснов М.С., Скрипникова В.С. и др. Экспериментальные модели культивирования тканей глаза тритона *Pleurodeles waltl* для исследования специфического действия активного в сверхмалых дозах биорегулятора склеры // Бюл. экспер. биол. и мед. 2010а. № 4. С. 393–395.
- Ямскова В.П., Краснов М.С., Ямсков И.А. Наноразмерные биорегуляторы тканей глаза млекопитающих как основа для фармакологических препаратов нового поколения. М.: Макс Пресс, 2009а. 82 с.
- Ямскова В.П., Краснов М.С., Ямсков И.А. К вопросу о механизмах, лежащих в основе процессов восстановления и репарации в тканях // Клет. техн. биол. и мед. 2010б. № 1. С. 32–35.
- Ямскова В.П., Краснов М.С., Ямсков И.А. Новые экспериментальные и теоретические аспекты в биорегуляции. Механизм действия мембранотропных гомеостатических тканеспецифических биорегуляторов. Saarbrücken: Lambert Acad. Publishing, 2012. 136 p.
- Ямскова В.П., Нечаева Н.В., Туманова Н.Б. и др. Исследование влияния макромолекулярных адгезионных факторов, выделенных из сыворотки крови и печени млекопитающих на интенсивность синтеза белка и содержания АТФ в гепатоцитах *in vitro* // Изв. РАН. Серия биол. 1994. № 2. С. 190–196.
- Ямскова В.П., Рыбакова Е.Ю., Виноградов А.А. и др. Исследование белка-инактиватора адгезивного гликопротеина из сыворотки крови млекопитающих // Прикл. биохим. микробиол. 2004. Т.40. № 4. С. 407–413.
- Ямскова В.П., Скрипникова В.С., Молявка А.А. и др. Структурно-функциональные особенности нового биорегулятора, выделенного из ткани пигментного эпителия глаза быка // Биохимия. 2009б. Т. 74. № 9. С. 1195–1203.
- Ямскова В.П., Туманова Н.Б., Логинов А.С. Сравнительное исследование действия экстрактов печени мышей линии С57В1 и СВА на адгезию гепатоцитов // Бюл. экспер. биол. и мед. 1990. № 3. С. 303–306.
- Aguillon-Gutierrez D.R., Krasnov M.S., Burlakova O.V. et al. Effects of endogenous bioregulators from mammalian blood serum and bone tissue on amphibian limb regeneration // J. Cyt. Tiss. Biol. 2020. V. 7. P. 025. <https://doi.org/10.24966/CTB-9107/100025>
- Babushkina T.A., Klimova T.P., Yamskov I.A. et al. Spin-lattice relaxation of water protons in serum adhesion protein (SAP) solutions of ultralow concentrations // J. Mol. Liq. 2005. V. 122. P. 84–86.
- Bissell M., Hall H., Parry G. How does extracellular matrix direct gene expression? // J. Theor. Biol. 1982. V. 99. P. 31–68.
- Borisenko A.V., Yamskova V.P., Krasnov M.S. et al. Regulatory proteins from the mammalian liver that display biological activity at ultralow doses // Biochemical physics frontal research / Eds S.D. Varfolomeev, E.B. Burlakova, A.A. Popov, G.E. Zaikov, Hauppauge, NY: Nova Sci. Publishers Inc., 2007. 35–44.
- Cotsarelis G., Cheng G., Dong G. et al. Existence of slow cycling limbal epithelial basal cells can be preferential stimulated to proliferate: implication on epithelial stem cells // Cell. 1989. V. 57. P. 201–209.
- Davanger M., Evenson A. Role of the pericorneal structures in renewal of corneal epithelium // Nature. 1971. V. 229. P. 560–561.
- Hancock J.T. Cell signaling. NY: Oxford Univ. Press Inc., 2005. 296 p.
- Ilyina A.P., Sidorsky E.V., Tregubov A.V. et al. Peptide-protein complex from cattle sclera: structural aspects and chaperone activity // Biochem. Biophys. Rep. 2020. V. 24. P. 1–10.
- Immunoassays: a practical approach / Ed. J.P. Gosling. Oxford: Oxford Univ. Press, 2000. P. 19–36.
- Lapillonne A., Clarke S.D., Heird W.C. Polyunsaturated fatty acids and gene expression // Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care. 2004. V. 7. № 2. P. 151–156.
- Lemaître V., D'Armiento J. Matrix metalloproteinases in development and disease // Birth Def. Res. C Embryo Today. 2006. V. 78 (1). P. 1–10.
- Kragh-Hansen U., Minchiotti L., Galliano M. et al. Human serum albumin isoforms: genetic and molecular aspects and functional consequences // Biochim. Biophys. Acta. 2013. V. 1830. № 12. P. 5405–5417.
- Krasnov M.S., Gurmizov E.P., Yamskova V.P. et al. Analysis of a regulatory peptide from the bovine eye lens: physicochemical properties and effect on cataract development *in vitro* and *in vivo* // Biochemical physics frontal research / Eds S.D. Varfolomeev, E.B. Burlakova, A.A. Popov, G.E. Zaikov, Hauppauge, NY: Nova Sci. Publishers Inc., 2007. P. 21–33.

- Marini I., Moschini R., Del Corso A., Mura U.* Chaperone-like features of bovine serum albumin: a comparison with α -crystallin // *Cell. Mol. Life Sci.* 2005. V. 62. P. 3092–3099.
- Moscona A.A.* Rotation – mediated histogenetic aggregation of dissociated cells // *Exp. Cell Res.* 1961. V. 22. P. 455–465.
- Moscona A.* Studies of cell aggregation: demonstration of material with selective cell-binding activity // *PNAS USA.* 1963. V. 49. P. 743–748.
- Nazarova P.A., Yamskova V.P., Krasnov M.S. et al.* Regulatory proteins biologically active in ultralow doses from mammalian glands and their secretions // *New trends in biochemical physics research* / Eds S.D. Varfolomeev, E.B. Burlakova, A.A. Popov, G.E. Zaikov. NY, Nova Sci. Publishers Inc., 2007. P. 73–82.
- Peters T. Jr.* All about albumin: biochemistry, genetics and medical applications. San Diego, CA: Academic Press, 1996. 432 p.
- Reichardt L.F.* Extracellular matrix molecules and their receptors // *Guidebook to the extracellular matrix and adhesion proteins* / Eds T. Kreis, R. Vale. Oxford: Oxford Univ. Press, 1993. 176 p.
- Sathyamoorthy N., Decker J.M., Sherblom A.P., Muchmore A.* Evidence that specific high mannose structures directly regulate multiple cellular activities // *Mol. Cell. Biochem.* 1991. V. 102. P. 139–147.
- Sharon N., Lis H.* Lectins. London, New York: Chapman and Hall, 1989. 127 p.
- Smith L.R., Cho S., Discher D.E.* Stem cell differentiation is regulated by extracellular matrix mechanics // *Physiology (Bethesda)*. 2018. V. 33. № 1. P. 16–25.
- Victorov I.V., Lyjin A.A., Aleksandrova O.P.* A modified roller method for organotypic brain cultures: free-floating slices of postnatal rat hippocampus // *Brain Res. Prot.* 2001. V. 7. P. 30–37.
- Vining K.H., Mooney D.J.* Mechanical forces direct stem cell behavior in development and regeneration // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2017. V. 18. P. 728–742.
- Weigel P.H.* Rat hepatocytes bind to synthetic galactoside surfaces via a patch of asialoglycoprotein receptors // *J. Cell. Biol.* 1980. V. 87. P. 855–861.
- Weigel P.H., Schmell E., Lee Y.C., Roseman S.* Specific adhesion of rat hepatocytes to beta-galactosides linked to polyacrylamide gels // *J. Biol. Chem.* 1978. V. 253 (2). P. 330–333.
- Wyatt A.R., Yerbury J.J., Ecroyd H. et al.* Extracellular chaperones and proteostasis // *Annu. Rev. Biochem.* 2013. V. 82. P. 2.1–2.28.
- Yamskova V.P., Krasnov M.S., Rybakova E.Yu. et al.* Analysis of regulatory proteins from bovine blood serum that display biological activity at ultralow doses: 2. Tissue localization and role in wound healing / *Biochemical physics frontal research* // Eds S.D. Varfolomeev, E.B. Burlakova, A.A. Popov, G.E. Zaikov. Hauppauge, NY: Nova Sci. Publishers Inc., 2007. P. 71–78.

The Role of Serum Albumin in the Conduction of a Regulatory Signal in Mammals

M. S. Krasnov^{a, *}, A. P. Ilyina^b, and V. P. Yamskova^{b, **}

^a*Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

^b*Institute of Problems of Bioregulation, Moscow, Russia*

**e-mail: embrmsk@mail.ru*

***e-mail: yamskova-vp@yandex.ru*

A review of data on the study of the structure, physicochemical properties and biological activity of protein-peptide complexes, localized extracellularly, participating in intercellular adhesion and activating cellular sources of regeneration in vertebrate tissues, is presented. Protein-peptide complex consists of certain isoforms of serum albumin and peptides – products of proteolysis of known membrane and adhesion proteins. The biological effect of protein-peptide complexes is characterized by the presence of tissue, but the lack of species specificity, as well as dose dependence. In solutions, protein-peptide complexes are in the form of nanosized particles; this state is associated with the manifestation of protein-peptide complex biological activity. A possible mechanism of the protein-peptide complexes structure and its interaction with the cell plasma membrane is considered.

Keywords: albumin, serum, bioregulators